

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶ : G01N 33/68	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 98/25147 (43) Fecha de publicación internacional: 11 de Junio de 1998 (11.06.98)
--	-----------	---

(21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00296

(22) Fecha de la presentación internacional:
1 de Diciembre de 1997 (01.12.97)

(30) Datos relativos a la prioridad:
 P 9602543 2 de Diciembre de 1996 ES
 (02.12.96)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
 UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
 [ES/ES]; Praza do Obradoiro, Pazo de San Xerome,
 E-15705 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): CASABIELL PINTOS, Xesús [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). PEREZ RODRIGUEZ, Francisco [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). PEREZ CAMIÑA, Jesús [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES). CASANUEVA FREJO,

Felipe [ES/ES]; Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Medicina, Facultade de Medicina, E-15705 Santiago de Compostela (ES).

(81) Estados designados: CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: PROCESS FOR THE QUANTITATIVE ASSAYING OF PROTEINS IN BIOLOGICAL MICROSAMPLES PREPARED IN ELECTROPHORESIS BUFFER

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS EN MICROMUESTRAS BIOLÓGICAS PREPARADAS EN TAMPON DE ELECTROFORESIS

(57) Abstract

Process for the quantitative determination of proteins in biological microsamples (0.002 mL) prepared in electrophoresis buffer. The samples are immobilised on chromatography paper and tinted with a Brilliant Blue Coomassie R-250 after removing the electrophoresis buffer by fixing/washing with acid methanol. The samples are then quantified in relation to their optical density by using a digital scanner and integration software. This process provides for the protein assays in aqueous microsamples as well as in samples dissolved directly in electrophoresis buffer which contains substances interfering strongly with other processes for the quantification of proteins. The fast, sensitive and economical process applies to the biomedical investigation and the clinical practice.

(57) Resumen

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras (0.002 mL) biológicas preparadas en tampón de electroforesis. Las muestras son inmovilizadas sobre papel de cromatografía, y teñidas con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 tras la eliminación del tampón de electroforesis por fijación/lavado con metanol ácido. Las muestras son seguidamente cuantificadas en base a su densidad óptica utilizando un escáner digital y un software de integración. Este método permite realizar mediciones de proteína en micromuestras acuosas, así como en muestras disueltas directamente en tampón de electroforesis, el cual contiene sustancias que interfieren fuertemente con otros métodos de cuantificación de proteínas. El procedimiento rápido, sensible y económico es de aplicación en la investigación biomédica y la práctica clínica.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	ExRepública Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelanda		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

TITULO

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.

5

DESCRIPCION

Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis.

El procedimiento para la determinación de la concentración de soluciones proteicas está basado en la adsorción de micromuestras a un soporte sólido, seguida de tinción con
10 Azul Brillante de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250, Color Index 42660) y cuantificación densitométrica. Esta técnica es sensible, de fácil realización y mínimo coste, presentando la particularidad de ser utilizable cuando las muestras han sido disueltas con dodecilsulfato de sodio (SDS: sodium dodecyl sulfate) o tampón de electroforesis (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 %
15 azul de bromofenol) (*Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685. 1970*).

La determinación de proteínas en los laboratorios de investigación clínica y biomédica se realiza en general mediante espectrofotometría UV-V, bien analizando la absorbancia a 280 nm (A₂₈₀) de la solución proteica, o bien mediante pruebas
20 colorimétricas, de las cuales las más empleadas son las del biuret, el ensayo de Lowry, el ensayo de Bradford y el ensayo del BCA.

La medición de la A₂₈₀ (*Warburg O, Christina W: Isolierung und Kristallisation des Gaerungsferments Enolase. Biochem. Z. 310: 384-421. 1941*) no constituye una medición directa de la cantidad de proteína presente, sino que refleja la abundancia de
25 residuos aromáticos en la cadena polipeptídica, por lo que el coeficiente de extinción molar de cada proteína varía entre amplios márgenes. Su uso se restringe fundamentalmente a la monitorización de fracciones en técnicas cromatográficas, y su rango de sensibilidad abarca de 0.2 a 2 mg/mL. Su principal ventaja es la de ser un método no destructivo.

La reacción del biuret para la determinación de proteínas fue uno de los primeros
30 métodos desarrollados para el análisis colorimétrico de las mismas (*Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol.*

Chem. 177: 751-766. 1949) y se usa todavía hoy extensamente en aplicaciones que requieren rapidez pero no una elevada sensibilidad. Se basa en el complejamiento del cobre en una disolución alcalina con el enlace peptídico de las proteínas, y también con los residuos de tirosina. Su principal inconveniente, es el gran número de sustancias que
5 interfieren con la misma, entre ellas numerosos tampones utilizados frecuentemente en biología (Tris, Hepes, Pipes, Mes, etc.).

El ensayo de Lowry (Lowry OH, Rosebrough NJ, Far LA, Randall RJ: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.* 193:265-275. 1951) ha sido la técnica más empleada para la determinación de proteínas hasta hace relativamente poco
10 tiempo. Es una ampliación del procedimiento del biuret en la que se forma un complejo de cobre-proteína en solución alcalina, que a su vez reduce un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico para dar un color azul intenso. A pesar de ser una técnica sensible (0.005 a 0.1 mg/mL) y muy específica, presenta varias desventajas que la han desplazado: Los reactivos utilizados son inestables; la cinética de la reacción es lenta, y numerosas
15 sustancias interfieren con la reacción.

El ensayo del BCA (bicinchoninic acid assay) (Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: *Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem.* 150: 76-85. 1985) es una variante del método de Lowry desarrollada recientemente, más sencilla de realizar y
20 menos sujeta a interferencias. En ella se utiliza el BCA como un sistema indicador para monitorizar el ion Cu^{1+} producido durante la reacción del biuret. Presenta un rango de sensibilidad de 0.01 a 1.2 mg/mL, pero la cinética de la reacción es lenta, requiriéndose incubaciones relativamente largas a temperaturas de hasta 60 °C para lograr la máxima sensibilidad.

25 El ensayo de Bradford (Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1975) es un método rápido para la determinación de la concentración de proteínas. Su rango de sensibilidad va de 0.1 a 2 mg/mL (en su formulación estándar) o de 0.01 a 0.2 mg/mL (formulación micrométodo). La base de la
30 técnica es la formación de un complejo insoluble azulado entre el colorante y la proteína que es cuantificado posteriormente en base a su absorbancia a 595 nm.

La posibilidad de determinar la concentración de proteína en micromuestras con las técnicas espectrofotométricas mencionadas, está condicionada al volumen mínimo necesario para realizar la lectura de la absorbancia, que es de 1.5 mL para las cubetas estándar, 0.5 mL para las cubetas semimicro, y 0.1 mL para las microcubetas (Tabla I).

- 5 Estas últimas no son sin embargo accesorios estándar incluidos con los espectrofotómetros más utilizados, debiendo ser adquiridas por separado y a un elevado coste.

TABLA I.- CANTIDAD MINIMA DE MUESTRA REQUERIDA PARA LECTURA (mL)

	Relación muestra:reactivo	Cubeta estándar (1.5 mL)	Cubeta semimicro (0.5 mL)	Cubeta micro (0.1 mL)
A280	-	1.500	0.500	0.100
Biuret	5:2	1.000	0.350	0.070
Lowry	1:5	0.300	0.100	0.020
BCA	1:20	0.080	0.025	0.005
Bradford	1:50	0.030	0.010	0.002

10

De los datos de la Tabla I se deduce que en el caso de utilizar microcubetas, son necesarios 0.002 mL en el caso del ensayo de Bradford y 0.005 mL en el caso del ensayo del BCA. En la práctica normal (cubeta semimicro) las cantidades consumidas en la mayoría de los laboratorios para realizar la medida de la concentración de proteína son de

15 0.010 y 0.025 mL, respectivamente.

La medición de la concentración de proteínas en muestras de pequeño volumen es por ello un problema práctico muy frecuente. Ninguna de las técnicas disponibles es aplicable directamente a situaciones en las que la cantidad de muestra disponible sea

limitante y especialmente cuando ésta contenga sustancias que interfieran con los métodos habituales de cuantificación de proteínas. Ello ocurre muy en particular cuando se usan técnicas de electroforesis en un laboratorio biomédico.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS es una de las técnicas analíticas más potentes y de uso más difundido para la resolución de mezclas proteicas complejas (*Laemmli UK. op. cit.*). Esta técnica ofrece un gran poder resolutivo, es fácil de realizar, reproducible, económica, y requiere cantidades mínimas de muestra (0.001 a 0.1 mL), por lo que se ha convertido en una técnica de rutina en los laboratorios de investigación clínica y básica. Su uso requiere conocer previamente la concentración de proteína en las muestras para: (1) evitar la sobrecarga del gel, con la consiguiente pérdida de resolución que conlleva; (2) asegurar la reproducibilidad de la técnica; y (3) permitir la obtención de datos cuantitativos y la comparación entre muestras problema.

En muchas circunstancias, el volumen total de muestra es mínimo, por lo que no se dispone de cantidades suficientes para realizar una determinación de la concentración de proteína en paralelo por métodos espectrofotométricos convencionales. Además, en caso de muestras muy pequeñas, lo habitual es solubilizarlas directamente en tampón de electroforesis (especialmente si la técnica ha requerido una precipitación previa de la proteína mediante ácido tricloroacético o acetona, o por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos). Este tampón (*Laemmli, op. cit*) contiene elevadas cantidades de SDS (típicamente un 2 % p/v) como agente solubilizador y desnaturalizante; un agente reductor como el mercaptoetanol (5 % v/v), y azul de bromofenol (0.002 % p/v) como colorante trazador. Estas sustancias, en las cantidades mencionadas, interfieren seriamente con todos los métodos habituales de determinación espectrofotométrica de proteínas (A₂₈₀, reacción del biuret, reacción de Bradford, reacción de Lowry, reacción del BCA), por lo que sería de extremada utilidad un método práctico para determinar la concentración de proteína en muestras así preparadas.

Se han propuesto varios métodos para tratar de resolver este problema, pero la mayoría de los mismos son relativamente poco sensibles y/o laboriosos. Así, el método de Schaffner (*Schaffner W, Weissmann C: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochem. 56: 502-514. 1973*) requiere la precipitación previa de las proteínas con ácido tricloroacético, tras lo cual el material

precipitado es recogido por filtración sobre filtros Millipore. Las proteínas son reveladas en los filtros por tinción con AmidoBlack 10B, colorante que es seguidamente eluido mediante etanol en medio básico, y cuantificado por espectrofotometría. A pesar de permitir la medición de micromuestras en presencia de SDS, resulta demasiado laborioso como método de aplicación general. Dos modificaciones de este método (Sheffield JB, Graff D, Li HP: *A solid-phase method for the quantitation of protein in the presence of sodium dodecil sulfate and other interfering substances. Anal. Biochem.* 166: 49-54. 1987); (Henkel AW, Bieger SC: *Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. Anal. Biochem.* 223: 329-331. 1994) se basan en la aplicación directa de las muestras a una membrana de nitrocelulosa, eliminándose los pasos de precipitación con ácido tricloroacético y filtración. Las muestras adsorbidas a la membrana son posteriormente teñidas con AmidoBlack 10B, que es a continuación eluido y cuantificado espectrofotométricamente. El procedimiento resulta menos laborioso, pero se requiere todavía la elución del colorante para la cuantificación de la proteína. Este problema es obviado en un procedimiento similar (Sportsman JR, Elder JH: *A microanalytical protein assay using laser densitometry. Anal. Biochem.* 139: 298-300. 1983), en el que la cuantificación del colorante se realiza mediante un densitómetro láser. Esta última técnica resulta sencilla de realizar y permite la cuantificación rápida y fiable de proteínas en el rango 0.1-1.0 mg/mL, usando muestras de 0.0025 mL (0.25 a 2.5 µg de proteína). Su principal problema lo constituye el soporte utilizado, la nitrocelulosa, quebradiza y poco manejable, y cuya capacidad de ligazón de proteínas se ve reducida por la presencia de SDS, por lo que la concentración utilizada se ha limitado al 1 % p/v.

El fundamento de la invención que aquí se describe es un procedimiento utilizado frecuentemente para la valoración semicuantitativa de proteínas (Coluccio LM, Bretscher A: *Calcium-regulated cooperative binding of the microvillar 110K-calmodulin complex to F-actin. J. Cell. Biol.* 105: 325-333. 1987) en fracciones cromatográficas. En este procedimiento las muestras (0.003 mL) son aplicadas directamente sobre una tira de papel de cromatografía, tras lo cual son teñidas simplemente con el colorante estándar utilizado para la tinción de los geles de electroforesis (Azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-acético), y destañadas con la solución de destinción estándar. Este procedimiento ha sido modificado para permitir la utilización directa de muestras preparadas en tampón

de electroforesis mediante la adición de un paso de fijación-lavado previo a la tinción, y se ha hecho cuantitativo mediante evaluación de la densidad óptica de las manchas proteicas en imágenes digitalizadas por medio de un escáner de sobremesa. Estos aparatos constituyen en la actualidad un accesorio ampliamente difundido en todos los laboratorios y centros de investigación debido a su precio reducido (menos de un 10 % del coste de un videodensitómetro o un densitómetro láser) y buenas prestaciones. Su utilización, acoplada a un software adecuado de análisis de imagen, permite mediciones precisas y fiables de densidad óptica en muestras digitalizadas (*Shea TB: An inexpensive densitometric analysis system using a Macintosh™ computer and a desktop scanner. BioTechniques, 16: 1126-1128. 1994*); (*Velleman SG: Quantifying immunoblots with a digital scanner. BioTechniques. 18: 1056-1058. 1995*).

La presente invención resuelve el problema técnico de la determinación de la cantidad de proteína en muestras de pequeño tamaño (0.002 mL), por lo que proponemos su uso como ensayo de proteínas de aplicación general para micromuestras. Muy en especial, resuelve el problema de las muestras solubilizadas previamente con SDS o tampón de electroforesis. Esta técnica es muy sencilla, rápida, reproducible, y requiere un equipamiento de bajo coste, disponible en la gran mayoría de los laboratorios clínicos y de investigación. Permite la determinación de la concentración de proteína en el rango 0.1-1 mg/mL, un rango similar al abarcado por el ensayo de Bradford, el más utilizado en la actualidad, aunque el pequeño volumen requerido permite la detección de cantidades de proteína tan pequeñas como 0.2-2 µg. Por último, la técnica no resulta afectada por la presencia de SDS hasta un 2 % p/v, o tampón de electroforesis.

El procedimiento se basa en el descrito originalmente por Coluccio y Bretscher en 1987 (op. cit.), que es únicamente semicuantitativo, modificado para eliminar la interferencia por SDS, beta-mercaptoetanol y azul de bromofenol (componentes del tampón que se utiliza habitualmente para disolver las muestras que van a ser analizadas por electroforesis sobre gel de poliacrilamida), y adaptado para la determinación cuantitativa.

MODO DE REALIZACION:

30

Material:

- 1.- Papel de filtro de calidad, grueso (BioRad, o Whatman 3MM Chr). Manipularlo siempre con guantes para no contaminarlo con proteínas cutáneas.
- 2.- Solución patrón de proteína: Albúmina Sérica Bovina (BSA), solución a 1 mg/mL en
5 agua destilada (si se van a medir muestras acuosas) o en tampón de electroforesis (para muestras disueltas en el mismo). Disponible comercialmente de varias fuentes, o preparada en el laboratorio a partir de una disolución de albúmina bovina a 10 mg/mL (absorbancia a 280 nm de 6.6).
- 3.- Solución de tinción: Azul Brillante de Coomassie R-250 (SERVA blue R) 1 mg/mL,
10 disuelto en Metanol:Acético:Agua (10:4:10), y filtrado a través de una membrana de 0.44 mm.
- 4.- Tampón de electroforesis de Laemmli (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 5 % beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.002 % azul de bromofenol):
- 5.- Solución de destinción: 12.5 % Metanol-10 % Acético.
- 15 6.- Secador: Lámpara de infrarrojos o secador de pelo manual.
- 7.- Escáner: Cualquier escáner de oficina capaz de trabajar a 8 bits (256 grises) y con una resolución de al menos 150 puntos por pulgada (En nuestro caso, Apple™ Color One).
- 8.- Ordenador personal: Cualquier ordenador capaz de controlar el escáner (Macintosh™ o PC compatible. En nuestro caso un Macintosh™ LC 475).
- 20 9.- Software de Integración: Cualquier paquete de software capaz de realizar lecturas de densidad óptica integrada a partir de la imagen generada por el escáner. En nuestro caso hemos utilizado NIH Image, un programa de dominio público para análisis digital de imagen en ordenadores Apple Macintosh™, elaborado por Wayne Rasband (U.S. National Institutes of Health) y disponible sin coste a través de Internet (por ftp al
25 servidor <zipppy.nimh.nih.gov>) o en diskette (National Technical Information Service, Springfield, Virginia, item número PB93-504868). Los mismos resultados pueden obtenerse con otros muchos paquetes de software, entre ellos Adobe Photoshop™, disponible para ordenadores Macintosh™ y PC-compatibles.

MÉTODO:

5

Preparar una curva estándar a partir del patrón de proteína. La utilizada por nosotros se prepara como sigue:

MUESTRAS ACUOSAS

Concentración (mg/mL)	Estándar 1 mg/mL (acuoso)	Agua
0.00	0	100
0.10	10	90
0.25	25	75
0.50	50	50
0.75	75	25
1.00	100	0

10

MUESTRAS PREPARADAS EN TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Concentración (mg/mL)	Estándar 1 mg/mL (en tampón)	Tampón de electroforesis
0.00	0	100
0.10	10	90
0.25	25	75
0.50	50	50
0.75	75	25
1.00	100	0

Pipetear 0.002 mL de cada uno de los puntos de la curva sobre el papel de filtro, espaciados regularmente, cuidando de no arañar la superficie del papel con la punta de la micropipeta. Podemos ayudarnos de un retículo de 1 x 1 cm dibujado previamente sobre el
5 papel con un lápiz blando, depositando cada muestra cuidadosamente en el centro de los cuadrados.

Pipetear 0.002 mL de cada muestra problema sobre el papel, de la misma manera que los patrones. Si la concentración inicial es totalmente desconocida, pueden pipetearse
10 varias diluciones diferentes de cada muestra.

Secar completamente el papel con la lámpara de infrarrojos o el secador. Alternativamente, dejar secar al aire, resguardándolo del polvo.

Fijación/lavado: Colocar el papel de filtro, una vez seco, en una cubeta con solución de destinción. Incubar con agitación suave hasta que el azul de bromofenol que contienen
15 las muestras desaparezca completamente. Si ninguna de las muestras a analizar contiene tampón de electroforesis, este paso puede eliminarse, procediéndose directamente desde el secado a la tinción.

Tinción: Retirar la solución de destinción y sustituirla por solución de tinción. Incubar 15 minutos, con agitación suave.

20 Destinción: Eliminar la solución de tinción (que puede ser reciclada varias veces) y sustituirla por solución de destinción. Incubar con agitación suave y cambiarla cada 15 minutos hasta obtener un fondo claro y uniforme.

Secado: Con la lámpara de infrarrojos, el secador, o en estufa. Alternativamente, dejar secar al aire en lugar resguardado del polvo.

25 Digitalización: De acuerdo con las instrucciones que acompañan al escáner, a 8 bits (256 grises) y 150 puntos por pulgada. Grabar la imagen resultante en un formato compatible con el software de integración (en general, en formato TIFF -*Tag Image File Format*-. No utilizar formatos que resulten en compresión con pérdida de datos, como JPEG).

30 Cuantificación: La metodología concreta dependerá del software utilizado. En general, definir una región de tamaño ligeramente superior al de la mancha de mayor

tamaño, y utilizarla para tomar lecturas de densidad óptica de cada uno de los estándares y las muestras. Graficar la curva estándar y extrapolar la concentración de proteína de las muestras problemas. El ensayo es lineal para la BSA en el rango 0.1-1 mg/mL tanto en muestras acuosas como en muestras preparadas en tampón de electroforesis. Es decir, aproximadamente el mismo rango que abarca el ensayo estándar de Bradford. Se obtienen resultados similares para otras proteínas, como amilasa, alcohol deshidrogenasa (ADH) y citocromo C (Citocr. C). Los resultados obtenidos para varias proteínas en solución acuosa se reflejan en la Tabla II. La Tabla III recoge los resultados para las mismas proteínas disueltas en tampón de electroforesis. En ambos casos se han realizado 14 determinaciones para cada una de las proteínas ($n = 14$). Los resultados obtenidos para la BSA se muestran gráficamente en la Figura 1 (en solución acuosa) y en la Figura 2 (en buffer de electroforesis), como las medias y desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas (eje Y) para cada concentración de proteína (eje X).

TABLA II.- Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en solución acuosa

(media \pm desviación estándar, $n=14$)

mg/mL	D E N S I D A D O P T I C A							
	BSA		AMILASA		ALCOHOL DESHIDROG.		CITOCROMO C	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0.00	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03
0.05	0.05	0.01	0.04	0.02	0.02	0.02	0.19	0.03
0.10	0.15	0.02	0.09	0.02	0.03	0.02	0.30	0.04
0.25	0.33	0.03	0.25	0.03	0.15	0.05	0.56	0.09
0.50	0.54	0.07	0.48	0.05	0.33	0.06	0.86	0.12
0.75	0.74	0.03	0.71	0.06	0.50	0.11	0.99	0.14
1.00	0.95	0.04	0.83	0.05	0.55	0.11	1.14	0.18

TABLA III.- Concentración vs. densidad óptica para varias proteínas en tampón de electroforesis

(media \pm desviación estándar, n=14)

mg/mL	D E N S I D A D O P T I C A							
	BSA		AMILASA		ALCOHOL DESHIDROG.		CITOCROMO C	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
0.00	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.16	0.07
0.10	0.13	0.06	0.09	0.05	0.13	0.06	0.33	0.13
0.25	0.40	0.08	0.32	0.08	0.40	0.08	0.71	0.17
0.50	0.70	0.10	0.63	0.11	0.66	0.11	1.08	0.15
0.75	0.92	0.13	0.83	0.10	0.88	0.08	1.27	0.12
1.00	1.07	0.14	1.00	0.12	1.00	0.09	1.42	0.13

5 Posibilidades de aplicación industrial:

Es una técnica de utilidad general como método para microdeterminación de proteínas en muestras de pequeño volumen. Es de destacar su utilidad en casos de muestras que contengan sustancias que interfieran con los métodos estándar de determinación de proteínas (concentración elevada de sales, presencia de detergentes o colorantes), ya que éstas son eliminadas durante la fijación/lavado en metanol ácido. Resulta especialmente aplicable en laboratorios clínicos y de investigación biomédica, al permitir evaluar de un modo rápido y sencillo la concentración de proteína de las muestras previamente a su caracterización electroforética.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la determinación cuantitativa de proteínas en micromuestras biológicas preparadas en tampón de electroforesis, caracterizado por la evaluación de la densidad óptica de las mismas tras: i) adsorción a papel cromatográfico de las muestras problema; ii) fijación/lavado en metanol ácido; iii) tinción con azul brillante de Coomassie R-250; iv) digitalización de la imagen obtenida con un escáner de sobremesa y v) análisis de la misma con un software de integración y un ordenador personal.
- 10 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por ser aplicable a micromuestras biológicas y clínicas de 0.002 mL.
- 15 3.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por ser aplicable a muestras acuosas, a muestras disueltas en SDS (2 % p/v), y a muestras disueltas en tampón de electroforesis.

Densidad
óptica

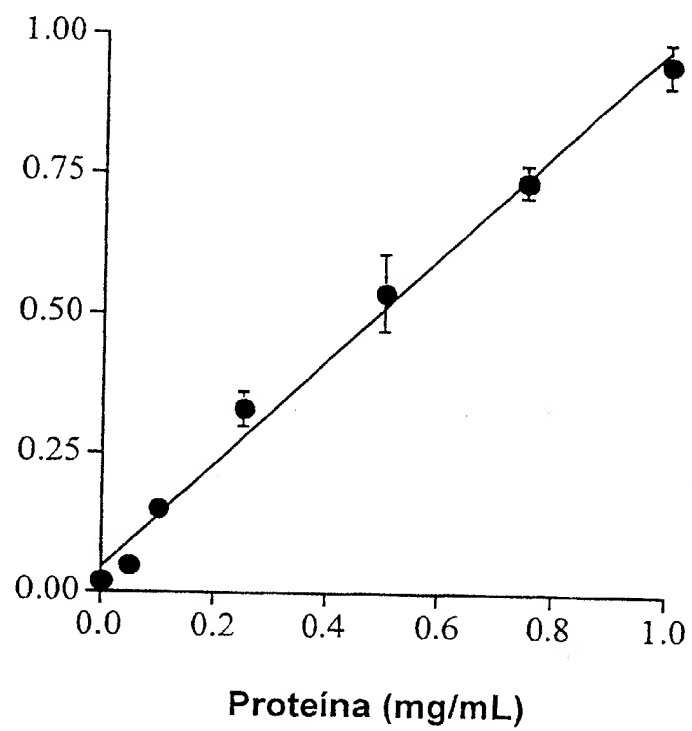


Figura 1

Densidad
óptica

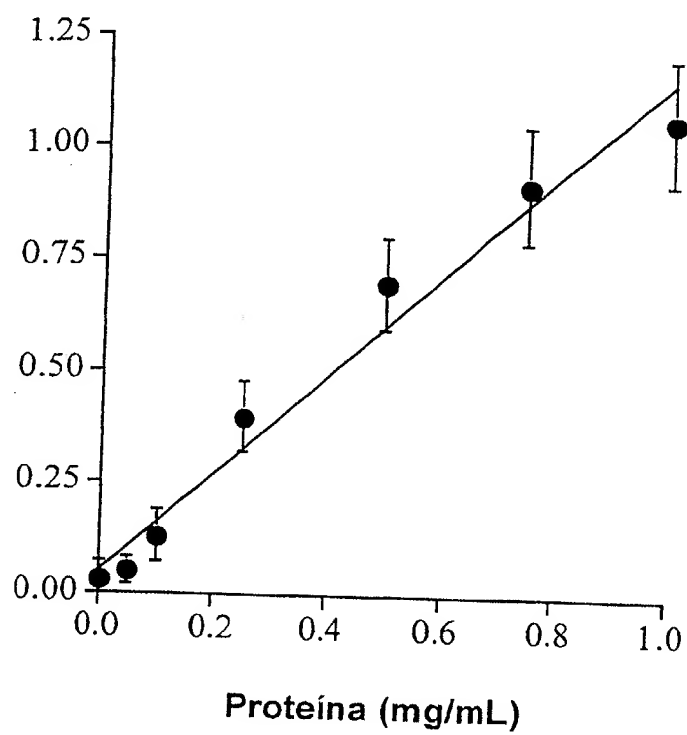


Figura 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 97/00296

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6: G01N 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHEA, T.B. "An Inexpensive Densitometric Analysis System Using a Macintosh TM Computer and Desktop Scanner". BIOTECHNIQUES. 1994. Vol. 16, No 6, pages 1126-1128. The whole document	1-3
X	KENDRICK, N.C. et al. "Optimization of an HP Scanjet for Quantification of Protein Electrophoresis Gels". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1994. Vol. 219, pages 297-304. The whole document	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 1998 (10.03.98)

Date of mailing of the international search report

18 March 1998 (18.03.98)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 97/00296

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ G01N 33/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	SHEA, T.B. "An Inexpensive Densitometric Analysis System Using a Macintosh TM Computer and a Desktop Scanner". BIOTECHNIQUES. 1994. Vol. 16, No 6, páginas 1126-1128. Todo el documento	1-3
X	KENDRICK, N.C. et al. "Optimization of an HP Scanjet for Quantification of Protein Electrophoresis Gels". ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1994. Vol. 219, pag. 297-304. Todo el documento	1-3

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.

10 Marzo 1998 (10.03.98)

Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional

18 MAR 1998 (18.03.98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado

M. NOVOA SANJURJO
n° de teléfono +34 1 3495552